



鸡IL-4在杆状病毒表达系统中的表达及其生物学活性分析

戴华* 陈俊华 徐正中 焦新安

扬州大学医学院/江苏省人兽共患病学重点实验室, 扬州 225009

*通讯作者, daihua@yzu.edu.cn

摘要 鸡(*Gallus gallus*)白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)是家禽2型辅助性T细胞(type 2 T helper, Th2)免疫应答的重要指示分子,对家禽免疫应答、免疫功能分析具有重要作用,由于缺乏有效的检测工具,关于鸡IL-4(*ChIL-4*)的研究目前较滞后。为制备具有生物学活性的重组*ChIL-4*,本研究采用分子生物学技术,从实验室前期构建的重组质粒pVAX1-*ChIL-4*中双酶切获得*ChIL-4*基因片段,并将其克隆入杆状病毒表达系统的转移载体pFastBac1,构建重组质粒pFast-*ChIL-4*,通过位点特异性转座,将*ChIL-4*基因整合到Bacmid穿梭载体中,构建重组质粒pBac-*ChIL-4*并转染草地贪夜蛾细胞系9(*Spodoptera frugiperda*, Sf9),进行蛋白表达;采用间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence, IFA)、间接酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)对重组*ChIL-4*(Bac-*ChIL-4*)的表达进行分析;采用鸡脾脏淋巴细胞增殖实验对重组蛋白的生物学活性进行初步分析。实验结果表明,重组*ChIL-4*在杆状病毒表达系统中获得成功表达,转染重组质粒Bac-*ChIL-4*的Sf9细胞中可见亮绿色荧光;将含有重组蛋白的Sf9细胞上清浓缩后进行间接ELISA检测,结果显示,抗*ChIL-4*的多抗血清仅识别重组*ChIL-4*;鸡脾脏淋巴细胞增殖实验结果表明,重组*ChIL-4*能够刺激鸡脾脏淋巴细胞的增殖,说明该重组蛋白具有较好的生物学活性。*ChIL-4*重组蛋白的获得为其进一步开发应用以及功能学研究提供了重要的生物材料。

关键词 鸡, 白细胞介素4(IL-4), 重组蛋白, 杆状病毒表达系统, 生物学活性

中图分类号 S852.4 文献标识码 A

Expression of Chicken (*Gallus gallus*) IL-4 in Baculovirus Vector System and Its Bioactivity Analysis

DAI Hua* CHEN Jun-Hua XU Zheng-Zhong JIAO Xin-An

Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

* Corresponding author, daihua@yzu.edu.cn

Abstract Chicken (*Gallus gallus*) interleukin-4 (IL-4), which is a key indicator for Th2 type immune response in poultry, is very important in immune response and immune function analysis of chickens (*Gallus gallus*). Due to the lack of effective assays, the study of chicken IL-4 (*ChIL-4*) is still lagged behind other cytokines. To prepare recombinant *ChIL-4* with high bioactivities, molecular biotechnology was used to construct recombinant vector pBac-*ChIL-4*, and then pBac-*ChIL-4* expressed in *Spodoptera frugiperda* 9 (Sf9) cells. Firstly, *ChIL-4* cDNA fragment was digested from plasmid pVAX1-*ChIL-4* constructed previously with restriction enzymes and then subcloned to vector pFastBac1 to construct a new plasmid pFast-*ChIL-4*. With site-specific transposition, *ChIL-4* cDNA fragment was transformed to vector bacmid in the baculovirus vector system to form recombinant plasmid pBac-*ChIL-4*. Secondly, pBac-*ChIL-4* was transfected to Sf9 cells

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30972171和No. 81472815)

收稿日期: 2017-02-08 接受日期: 2017-03-26

to generate recombinant ChIL-4 protein (rChIL-4 or Bac-ChIL-4). Finally, infected Sf9 cells were identified by immunofluorescent assay (IFA) for its expression of ChIL-4, and the supernatants of Sf9 cells infected were harvested and further analyzed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and lymphocytes proliferation assay. The results of IFA indirect ELISA showed that rChIL-4 successfully expressed in the baculovirus vector system with bright green fluorescence observed in transfected Sf9 cells, polyclonal antibody against ChIL-4 generated previously could only reacted with rChIL-4 (Bac-ChIL-4, His-ChIL-4), but not other irrelative proteins (bovine IL-4, chicken IFN- γ) revealed by ELISA. Splenocytes proliferation assay demonstrated that rChIL-4 had good bioactivity in stimulating and activating T lymphocytes. This study not only facilitates the structural and functional analysis of ChIL-4, but also provides helpful reference value for the expression of other cytokines.

Keywords Chicken, Interleukin-4 (IL-4), Recombinant protein, Baculovirus vector system, Bioactivity

白细胞介素4(interleukin-4, IL-4)最初被认为是B细胞的活化因子,具有刺激B细胞活化、增殖,增强其免疫应答能力等广泛的作用。进一步研究发现,IL-4还是一种多效能的T细胞活化因子,其主要为Th2型细胞所分泌,是刺激Th细胞分化的主要因素,影响着机体的Th/Th2平衡(Chtanova, Mackay, 2001; Zhu, 2015; Bao, Reinhardt, 2015; Sahoo et al., 2016)。IL-4除了对多种免疫细胞、非免疫细胞具有免疫调节作用外,对机体的炎症应答或过度炎症反应具有重要作用(Ma., 2016)。当面临病原微生物感染时,机体经常表现为以干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)的分泌为特征的Th1应答以及以IL-4分泌为特征的Th2应答模式,Th1/Th2模式的转换对机体抗感染免疫应答具有重要的作用,其中以IL-4的增多为特征的体液免疫应答对于抗寄生虫等感染具有很好免疫保护作用,但同时IL-4应答过强也会导致局部炎症反应加重等问题(Annamalai, Selvaraj, 2012; Parthasarathy, Mansfield, 2009)。IL-4的上述作用相对其他细胞因子而言,其受种属限制相对较大。哺乳类动物IL-4的研究较广泛、深入,并已在科研及临床中得到有效应用,但鸡(*Gallus gallus*) IL-4(*ChIL-4*)基因在2004年才得到明确报道,此后IL-4在家禽免疫系统中的作用也逐渐得到重视。ChIL-4 cDNA长度为414 bp,编码的蛋白有137个氨基酸,其中前25个氨基酸为信号肽,成熟蛋白由112个氨基酸组成(Avery et al., 2004)。有研究发现,ChIL-4具有良好的免疫佐剂作用,将*ChIL-4*基因与新城疫病毒融合蛋白(fusion protein, F)或禽流感病毒血凝素-神经氨酸酶(hemagglutinin-neuraminidase, HN)蛋白编码基因共同克隆入真核载体,免疫鸡群,可以增强群体的免疫保护能

力,提高免疫保护力(Sawant et al., 2011)。但ChIL-4在体内表达极微量,且实际中又缺乏有效的检测方法,IL-4在家禽的体液免疫方面的作用较少得到揭示。为此,本研究在前期工作(戴华等, 2008)基础上,利用昆虫细胞表达系统制备具有生物学活性的重组ChIL-4(rChIL-4),为进一步研究其生物学功能,不断丰富家禽免疫应答研究而提供生物材料。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

pFastBac1载体购自Invitrogen公司(美国);重组质粒pVAX1-*ChIL-4*由本实验室构建、保存(戴华等, 2006);大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH10Bac(含杆状病毒系统的穿梭质粒Bacmid和辅助质粒)购自Invitrogen公司(美国),大肠杆菌DH5 α 由本实验室保存;草地贪夜蛾卵巢细胞系9(*Spodoptera frugiperda* 9, Sf9)、野生型杆状病毒(wild type *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*, wtAcNPV)由本实验室保存;重组鸡(*Gallus gallus*)IL-4 (rChIL-4)、重组牛(*Bos taurus*) IL-4 (His-BovIL-4)、重组鸡IFN- γ (His-ChIFN- γ)、抗ChIL-4高免血清由本实验室制备、保存(戴华等, 2005, 2008; 陈祥等, 2008)。昆虫细胞培养基Sf 900 II购自Gibco公司(美国);异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗鼠IgG二抗,淋巴细胞分离液(FICOLL-Hypaque 1.078)均购自Sigma公司(美国);胎牛血清购自Hyclone公司(美国);分子生物学技术所涉及的各种酶均购自Takara公司(日本);脂质体转染试剂购自Invitrogen公司(美国);Agrose Gel DNA Extraction Kit购自QIAGEN公司(德国),BrdU ELISA

Kit购自Roche公司(美国);其他常规试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 重组转移载体的构建

将pVAX1-*ChIL-4*、pFastBac1分别经EcoR I和Xho I双酶切,分别回收ChIL-4及pFastBac1片段。将该两片段分别纯化后,经T₄ DNA连接酶连接后,4℃过夜。次日,连接产物转化DH5 α 感受态,过夜培养,挑取单菌落、提取质粒。随后,采用双酶切鉴定,将鉴定为阳性的质粒命名为pFast-*ChIL-4*,将重组菌并送生工生物工程有限公司测序。

1.3 重组杆状病毒表达质粒的构建和鉴定

重组质粒pFast-*ChIL-4*经测序正确后,将其加入大肠杆菌DH10Bac感受态细胞,通过位点特异性转座法将*ChIL-4*基因整合到杆状病毒的穿梭载体Bacmid中,具体参照文献步骤进行(孔桂美等,2005;戴华等,2009)。用SOC培养基(2% (W/V) 胰蛋白胨,0.5% (W/V) 酵母提取物,0.05% (W/V) NaCl,2.5 mmol/L KCl,10 mmol/L MgCl₂,20 mmol/L 葡萄糖)按1:10、1:100梯度稀释培养物,各取100 μ L涂布Luria平板(含卡那霉素、庆大霉素、四环素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)和5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-d-galactopyranoside, X-Gal)),置于37℃,48 h。挑取平板上的白色菌落,用含上述抗性的Luria平板进行4轮筛选纯化。最后挑取平板上的白色菌落,提取质粒。按照Invitrogen公司说明书(Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System)进行PCR鉴定,采用上述说明书推荐的通用引物M13对最终获得的纯化转座子进行扩增。按照Bac-to-Bac杆状病毒表达系统推荐方法进行:重组质粒(100 ng)1 μ L,10 \times PCR buffer 1 μ L,10 mmol/L dNTP Mix 1 μ L,50 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L,PCR Primers 2.5 μ L,sterile water 38.5 μ L,Taq酶0.5 μ L,50 μ L体系。具体程序:93℃变性3 min;94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸5 min,30个循环;72℃延伸7 min。将鉴定为阳性的质粒命名为pBac-*ChIL-4*,引物由生工生物工程有限公司合成(上海)。

1.4 转染及间接免疫荧光法鉴定

按照Invitrogen公司说明书的转染程序及戴华

等(2009)的步骤,用脂质体转染试剂Lipfectamin 2000将重组质粒pBac-*ChIL-4*、野生型病毒质粒Bacmid分别转染Sf9细胞,置于27℃,5 h后换用含抗生素的Grace培养基(Gibco公司,美国)。3 d后观察细胞病变,收集转染后72 h的细胞培养上清,6 000 r/min离心,收集上清,置于4℃,避光保存,即为P1代病毒。将转染的细胞继续培养至120 h,弃上清,将余下的细胞用-20℃预冷的甲醇固定5 min;预冷的含0.05%吐温的磷酸盐缓冲液(Tween-phosphate buffered saline, PBST)洗涤3次,弃上清,置室温吹干;加入适当稀释的自制抗ChIL-4多抗血清,37℃孵育60 min;PBST洗涤后,加入1:150稀释的FITC标记的羊抗鼠IgG(H+L),37℃,30 min;PBST洗涤后,置荧光显微镜下观察。

1.5 间接酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)分析重组蛋白Bac-ChIL-4的表达

参照孔桂美等(2005),将上述获得的P1代病毒以1个感染复数(multiplicity of infection, MOI)的量感染Sf9细胞(病毒:细胞比例为1:1),置培养箱27℃,96 h后,收集表达细胞的上清,离心,即为rChIL-4(Bac-*ChIL-4*),置于-20℃保存。将获得的含有Bac-ChIL-4蛋白的细胞上清浓缩后包被ELISA板,同时设立阳性抗原包被板His-*ChIL-4*,以及无关抗原:His-BovIL-4、His-ChIFN- γ 包被板(均为10 μ g/mL),上述各包被抗原均用pH 8.6的碳酸盐包被缓冲液稀释后包被ELISA板,50 μ L/孔,同时设立非免疫鼠血清组、仅PBS组作为一抗的阴性对照及空白对照;用实验室前期制备的抗ChIL-4的多抗血清(戴华等,2005)孵育酶标板,50 μ L/孔;经50 μ L/孔的辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠酶标二抗孵育后,3,3',5,5'-四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB)显色液显色,1 mol/L H₂SO₄终止反应,酶标仪读取各孔的OD₄₅₀值。

1.6 淋巴细胞增殖实验

无菌取6周龄SPF莱杭鸡(扬州维克斯生物科技有限公司提供)脾脏,经研磨制备成单细胞悬液,红细胞裂解液裂解、离心去除红细胞,RPMI 1640培养基(Gibco公司,美国)重悬细胞并小心地将细胞悬液加入FICOLL 1.078淋巴细胞分离液(Sigma,美国)上层,置4℃离心机,1 600 r/min离心,20

min, 小心吸取中间云雾状细胞层, 细胞经含 2% 小牛血清的 PBS 洗涤 2 次, 用含 10% 胎牛血清的 RP-MI 1640 重悬淋巴细胞, 计数、调整至 5×10^6 个/mL, 分装至 96 孔细胞培养板, 100 μ L/孔。实验组分别加入终浓度为 5、10 和 20 ng/mL 的 Bac-ChIL-4 重组蛋白, 阳性对照组为终浓度 20 μ g/mL 的伴刀豆球蛋白 A (concanavalin A, Con A) 刺激孔, 同时设立培养基对照组, 每组设 3 个复孔。将细胞培养板置 41 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 细胞培养箱培养。48 h 后, 按照 BrdU proliferation ELISA kit 说明书的具体要求, 添加工作浓度的 BrdU 标记液, 10 μ L/孔, 置 41 $^{\circ}$ C 继续培养 12 h; 随后离心去除 BrdU 标记液, 1 000 r/min, 10 min; 60 $^{\circ}$ C 烘干 1 h; 加入固定液 FixDenat, 200 μ L/孔, 室温固定 30 min; 同上离心去除固定液, 加入 anti-BrdU-POD 酶标工作液, 200 μ L/孔, 室温孵育 1.5 h; 同上离心弃酶标液, washing buffer 洗涤 3 次; 加入 TMB 显色液, 100 μ L/孔, 继续孵育 15~30 min, 然后加入 1 mol/L H_2SO_4 , 25 μ L/孔, 300 r/min 震荡 1 min; 酶标仪读取各孔的 OD_{450} 值。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pFast-ChIL-4 的鉴定

应用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对重组质粒 pVAX1-*ChIL-4* 进行双酶切, 获得 *ChIL-4* 基因片段, 随后将 *ChIL-4* 片段克隆入杆状病毒表达系统的转移载体 pFastBac, 双酶切鉴定结果显示, 在约 4.8 kb 以及 420 bp 的位置处出现条带, 与载体及 *ChIL-4* 基因片段大小相符(图 1), 表明本研究成功构建了重组质粒 pFast-*ChIL-4*。

2.2 重组质粒 pBac-ChIL-4 的鉴定

采用 Invitrogen 公司公布的 M13 上、下游引物, PCR 法鉴定重组质粒 pBac-*ChIL-4*, 结果显示, 扩增出 2 800 bp 左右的特异性条带, 该条带的大小与 mini-att Tn7 和 *ChIL-4* 片段两者合计的大小相符, 而 PCR 扩增野生型质粒 pBacmid 只出现了大小约 300 bp 的片段(图 2), 表明获得了重组质粒 pBac-*ChIL-4*, 转座成功。

2.3 间接免疫荧光法分析重组蛋白 Bac-ChIL-4 的表达

将上述获得的 pBac-*ChIL-4* 质粒经脂质体转染

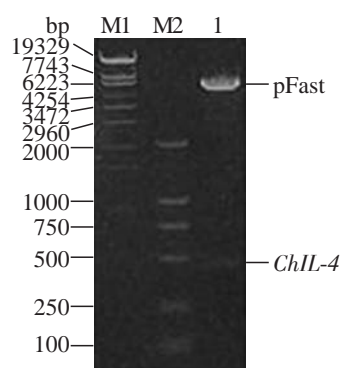


图 1 pFast-*ChIL-4* 的双酶切鉴定

Figure 1 pFast-*ChIL-4* with double enzyme digestion

M1: λ DNA /*Hind* III + *EcoR* I; M2: DL2000 DNA ladder; 1: 质粒 pFast-*ChIL-4* 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切结果

M1: λ DNA /*Hind* III + *EcoR* I; M2: DL2000 DNA ladder; 1: pFast-*ChIL-4* digested with *EcoR* I and *Xho* I

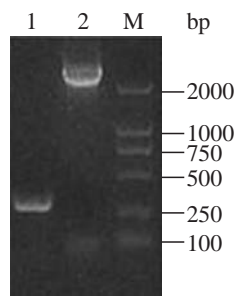


图 2 PCR 扩增鉴定重组质粒 pBac-*ChIL-4*

Figure 2 Identification of recombinant pBac-*ChIL-4* by PCR amplification

M: DL2000 DNA ladder; 1: 野生型质粒的 PCR 扩增结果; 2: pBac-*ChIL-4* 的 PCR 扩增结果

M: DL2000 DNA ladder; 1: PCR product of bacmid; 2: PCR product of pBac-*ChIL-4*

Sf9 细胞, 经抗 ChIL-4 多抗血清孵育、FITC 标记的羊抗鼠 IgG(H+L) 染色后, 在荧光显微镜下观察, 转染了重组质粒 pBac-*ChIL-4* 的 Sf9 细胞与多抗孵育后, 在 Sf9 的胞浆内和胞膜上都可见亮绿色荧光, 而转染野生病毒的 Sf9 细胞未能观察到荧光, 说明经 pBac-*ChIL-4* 转染的 Sf9 细胞有效表达了重组蛋白 Bac-ChIL-4(图 3)。

2.4 ELISA 分析重组蛋白 Bac-ChIL-4

将 Bac-ChIL-4、His-ChIL-4、His-BovIL-4、His-ChIFN- γ 蛋白包被 ELISA 板并经抗 ChIL-4 多抗血清孵育后, ELISA 检测结果表明, 抗 ChIL-4 高免血清能够与重组蛋白 Bac-ChIL-4 及阳性对照 His-ChIL-4 蛋白发生反应, 而与 His-BovIL-4、His-

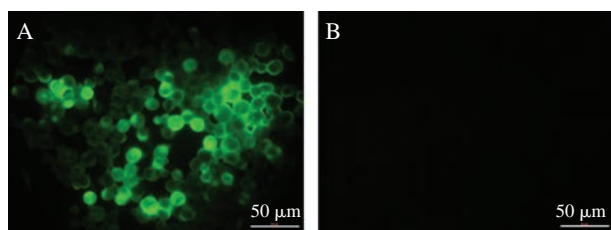


图3 间接免疫荧光法分析重组蛋白 Bac-ChIL-4 的表达
Figure 3 Identification of recombinant Bac-ChIL-4 by indirect immunofluorescent assay

A. 转染 pBac-ChIL-4 的草地贪夜蛾细胞系 9(Sf9) 细胞; B. 转染 bacmid 的 Sf9 细胞

A. *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells incubated with anti-ChIL-4 serum after transfection with recombinant pBac-ChIL-4; B. Sf9 cells incubated with anti-ChIL-4 serum after transfection with bacmid

ChIFN- γ 无反应(图4)。该结果进一步肯定了重组 ChIL-4 在杆状病毒表达系统中得到成功表达, 该蛋白能够被抗 ChIL-4 血清识别, 结合能力强。

2.5 鸡脾脏淋巴细胞增殖实验分析重组 Bac-ChIL-4 的生物学活性

在铺了鸡脾脏淋巴细胞的 96 孔板内, 分别加入不同浓度的 Bac-ChIL-4 刺激后, 用 BrdU-ELISA 试剂盒进行检测。结果表明, 将刺激剂添加入鸡脾脏淋巴细胞各孔内进行孵育, rChIL-4 刺激组较培养基对照组能够显著刺激鸡脾脏淋巴细胞增殖。而且, 随着 rChIL-4 刺激浓度从 5 ng/mL 升高到 10 ng/mL, 重组蛋白刺激淋巴细胞增殖的能力明显增强, 但 10 与 20 ng/mL 组之间无显著性差异。较 Con A 刺激组, 重组蛋白组的刺激效果略低(图5)。

3 讨论

IL-4 作为一类重要的免疫细胞因子, 在体内的作用非常广泛, 对机体的炎症应答发生、炎症性过敏反应、哮喘以及组织修复等具有广泛的影响, 此外, 还参与机体的免疫调节、造血系统功能, 对 Th2 型细胞为主的多种细胞均具有促进增生等重要生理活动, 在抵抗外来病原体侵袭及维持机体内环境平衡中均起重要作用(Paul, 1991; Annamalai, Selvaraj, 2012; Bao, Reinhardt, 2015; Buzney et al., 2016)。IL-4 主要由 Th2 类细胞产生, 具有促进 B 细胞增殖、增强其表面主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)类分子的表达以

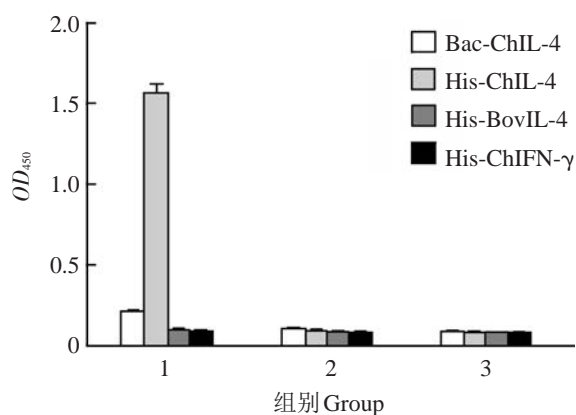


图4 ELISA 分析重组蛋白 Bac-ChIL-4 的表达
Figure 4 The analysis of recombinant protein Bac-ChIL-4 derived from baculovirus expression system

1: 高免疫血清; 2: 阴性对照; 3: PBS 空白对照
 1: Hyperimmunized serum against rChIL-4; 2: Non-relative serum control; 3: PBS (blank control)

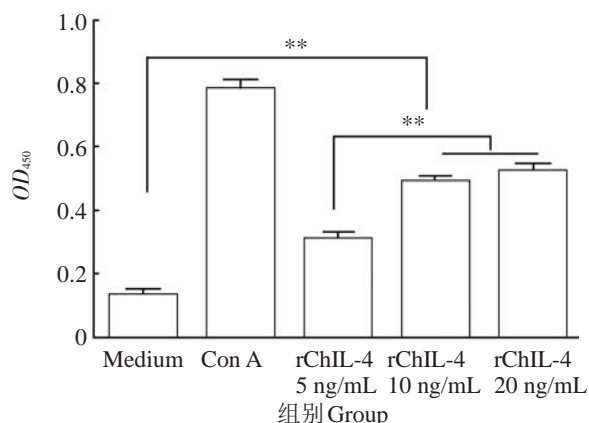


图5 BrdU 细胞增殖 ELISA 试剂盒分析 Bac-ChIL-4 的活性
Figure 5 the activity of Bac-ChIL-4 analyzed by BrdU cell proliferation ELISA

Medium: 对照; Con A: 伴刀豆球蛋白 A 刺激组
 Medium: Control group; Con A: Concanavalin A group

及促进抗体类转换等功能, 并能抑制机体的细胞免疫应答, 促进体液免疫应答的作用(Woods et al., 2001; Wan et al., 2017; Roesner et al., 2016)。目前, 人们对哺乳类生物的 Th2 类细胞因子的研究相对深入, 而关于家禽 IL-4 等 Th2 类细胞因子的研究则报道较少, 其原因是缺乏有效的检测方法。家禽 Th2 类免疫应答在细菌性感染、寄生虫病等感染性疾病的发生、发展过程中起着重要的作用, 而抗 IL-4 的治疗则可以有效控制或逆转一定的炎症性应答, 维护恰当的 Th1/Th2 平衡(Yang et al., 2013; Matsunaga, Yamauchi, 2016; Buzney et al., 2016)。

有研究表明,静脉注射杆状病毒表达系统所表达的猪(*Sus scrofa*)IL-4可阻止炎症因子的过量表达,对机体的过度炎症应答具有调控作用,从而防止宿主过度免疫应答而招致的损伤,促进抗原特异性体液免疫应答的发生,但其刺激前炎症因子发挥免疫调节作用也与注射IL-4的时间点密切相关(Nun-taprasert et al., 2005)。

由于IL-4这类细胞因子在机体内的表达水平很低,不可能直接从机体进行提取、纯化以研发制剂或制备其特异性抗体,从而对其生物学功能进一步阐释。因此,常用的是通过基因工程技术来获得大量重组IL-4。Bac-to-Bac杆状病毒表达系统因为其在外源基因插入、克隆后,重组病毒易于筛选、且翻译后的加工修饰系统较传统的大肠杆菌表达系统要完备,可高效表达外源基因、表达产物具有良好的生物学活性等特点,已经被广泛应用于外源蛋白的表达(孔桂美等, 2005; 刘向阳等, 2014; 黄娟等, 2016)。ChIL-4 cDNA由411个碱基构成,成熟蛋白由112个氨基酸组成(Avery et al., 2004),本研究将*ChIL-4*基因克隆入杆状病毒表达系统的转移载体pFastBac载体上,然后转化DH10Bac感受态,通过转座的方式将外源基因成功插入,获得携带外源基因的重组质粒pBac-*ChIL-4*,将其转染昆虫细胞Sf9后,通过IFA、ELISA等方法对蛋白的表达情况进行验证,并采用淋巴细胞增殖实验进一步分析其生物学活性。这些结果均有力地表明外源基因完全可以在Bac-to-Bac系统内获得高效表达,且具有较好的生物学活性。相比较原核表达的外源蛋白,Bac-to-Bac系统获得的重组蛋白生物学活性较高,这可能是因为大肠杆菌表达系统获得的重组蛋白不能进行糖基化修饰,且蛋白折叠效果不够所导致(孔桂美等, 2005)。

4 结论

本研究从实验室前期制备的重组质粒(戴华等, 2008)中酶切*ChIL-4*基因片段并克隆入杆状病毒表达系统,转染Sf9细胞后,IFA、ELISA结果均证实其在杆状病毒表达系统中获得成功表达。将该重组蛋白进行活性检测,发现该重组蛋白具有刺激鸡脾脏淋巴细胞增殖的能力。进一步说明,昆虫细胞-杆状病毒表达系统完全可以表达具有生物学活性的蛋白质,这为微量细胞因子等的制备、研究

提供了有效的模型。该重组ChIL-4蛋白的获得为进一步研究其生物学功能,并将为建立有效的检测ChIL-4的方法提供必要的生物材料。

参考文献

- 陈祥,张成全,徐正中,等. 2011. 重组牛白细胞介素4的原核表达及其单克隆抗体研制[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 27(6): 653-656. (Chen X, Zhang C Q, Xu Z Z, et al. 2011. Prokaryotic expression of recombinant bovine IL-4 and development of monoclonal antibodies against bovine IL-4 [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 27(6): 653-656.)
- 戴华,焦新安,黄金林,等. 2005. 抗鸡 γ -干扰素单克隆抗体的研制及初步鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 22(4): 510-512. (Dai H, Jiao X A, Huang J L, et al. 2006. Preparation and characterization of monoclonal antibodies against chicken interferon- γ [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 22(4): 510-512.)
- 戴华,郑佳玉,陈俊华,等. 2008. 鸡白细胞介素4基因的克隆及其原核表达[J]. 预防兽医学报, 30(6): 473-477. (Dai H, Zheng J Y, Chen J H, et al. 2008. Cloning and expression of chicken interleukin-4 gene [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 30(6): 473-477.)
- 戴华,季琰,郑佳玉,等. 2009. 鸡 γ -干扰素在杆状病毒系统中的表达[J]. 生物技术通讯, 20(6): 810-813. (Dai H, Ji Y, Zheng J Y, et al. 2009. Expression of recombinant chicken IFN- γ in baculovirus vector system [J]. Letters in Biotechnology, 30(6): 473-477.)
- 黄娟,袁飞,韩先杰,等. 2016. 猪圆环病毒2 d亚型衣壳蛋白在昆虫细胞中的表达[J]. 农业生物技术学报, 24(9): 1346~1353. (Huang J, Yuan F, Han X J, et al. 2016. Expression of porcine circovirus subtype 2 d capsid protein in baculovirus/insect cell expression system [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 24(9): 1346-1353.)
- 刘向阳,孙修炼,张忠信,等. 2014. 苹果蠹蛾颗粒体病毒(CpGV)GP37蛋白在Bac-to-Bac系统中的表达和亚细胞定位[J]. 农业生物技术学报, 22(5): 552~560. (Liu X Y, Sun X L, Zhang Z X, et al. 2014. Expression in Bac-to-Bac baculovirus system and localization in infected cells of *Cydia pomonella granulovirus* (CpGV) GP37 [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 22(5): 552-560.)
- 孔桂美,许金俊,秦爱建,等. 2005. 重组鸡 γ -干扰素在昆虫细胞中的高效表达[J]. 微生物学报, 45(5): 697-701. (Kong G M, Xu J J, Qin A J, et al. 2005. High level ex-

- pression of recombinant chicken interferon-gamma in insect cells [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 45 (5): 697-701.)
- Annamalai T, Selvaraj R K. 2012. Effects of in ovo interleukin-4 plasmid injection on anticoccidia immune response in a coccidia infection model of chickens [J]. *Poultry Science*, 91(6): 1326-1334.
- Avery S, Rothwell L, Winfried D J, et al. 2004. Characterization of the first nonmammalian T2 cytokine gene cluster: the cluster contains functional single-copy genes for IL-3, IL-4, IL-13, and GM-CSF, a gene for IL-5 that appears to be a pseudo gene, and a gene encoding another cytokine like transcript, KK34 [J]. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 24: 600-610.
- Bao K, Reinhardt R L. 2015. The differential expression of IL-4 and IL-13 and its impact on type-2 immunity [J]. *Cytokine*, 75(1): 25-37.
- Buzney C D, Gottlieb A B, Rosmarin D. 2016. Asthma and atopic dermatitis: A review of targeted inhibition of interleukin-4 and interleukin-13 as therapy for atopic disease [J]. *Journal of Drugs in Dermatology*, 15(2): 165-171.
- Chtanova T, Mackay C R. 2001. T cell effector subsets: Extending the Th1/Th2 paradigm [J]. *Advances in Immunology*, 78: 233-266.
- Ma XJ. 2016. Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases [M]. Springer Science, Netherlands. pp. 31-78.
- Matsunaga M C, Yamauchi P S. 2016. IL-4 and IL-13 inhibition in atopic dermatitis [J]. *Journal of Drugs in Dermatology*, 15(8): 925-929.
- Nuntaprasert A, Mori Y, Muneta Y, et al. 2005. The effect of recombinant swine interleukin-4 on swine immune cells and on pro-inflammatory cytokine productions in pigs [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 28: 83-101.
- Parthasarathy G, Mansfield L S. 2009. Recombinant interleukin-4 enhances *Campylobacter jejuni* invasion of intestinal pig epithelial cells (IPEC-1) [J]. *Microbial Pathogenesis*, 47(1): 38-46.
- Paul W E. 1991. Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine [J]. *Blood*, 77(9): 1859-1870.
- Roesner L M, Heratizadeh A, Wieschowski S, et al. 2016. α -NAC-specific autoreactive CD8⁺ T cells in atopic dermatitis are of an effector memory type and secrete IL-4 and IFN- γ [J]. *The Journal of Immunology*, 196(8): 3245-3252.
- Sahoo A, Wali S, Nurieva R. 2016. T helper 2 and T follicular helper cells: Regulation and function of interleukin-4 [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 30: 29-37.
- Sawant P M, Verma P C, Subudhi P K, et al. 2011. Immunomodulation of bivalent Newcastle disease DNA vaccine induced immune response by co-delivery of chicken IFN- γ and IL-4 genes [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1-2): 36-44.
- Wan F F, Yan K P, Xu D, et al. 2017. V γ 1+ γ δ T, early cardiac infiltrated innate population dominantly producing IL-4, protect mice against CVB3 myocarditis by modulating IFN- γ + T response [J]. *Molecular Immunology*, 81: 16-25.
- Woods J M, Katschke K J, Volin M V, et al. 2001. IL-4 adeno-viral gene therapy reduces inflammation, proinflammatory cytokines, vascularization, and bony destruction in rat adjuvant-induced arthritis [J]. *Journal of Immunology*, 166(2): 1214-1222.
- Yang X, Xiao Y L, Chen J L, et al. 2013. Potentiation of immunity of piglets to mycoplasma hyopneumoniae vaccine with fused gene for pig IL-4 and IL-6 embodied in chitosan nanoparticles [J]. *Procedia in Vaccinology*, 7: 15-22.
- Zhu J. 2015. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production [J]. *Cytokine*, 75(1): 14-24.